

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

**Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.**

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nlegungsschrift
⑪ DE 3134611 A1

⑤ Int. Cl. 3:
G 01 N 1/28

⑳ Aktenzeichen:
㉔ Anmeldetag:
㉕ Offenlegungstag:

P 31 34 611.1
1. 9. 81
10. 3. 83

㉑ Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

㉒ Erfinder:
Klose, Sigmar, Dr.-Phil., 8131 Berg, DE; Stähler, Fritz,
Dr.-med., 8132 Tutzing, DE

Behörden Eigentum

⑤④ Verfahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen und hierfür geeignetes Mittel

Zur Durchführung analytischer Bestimmungen durch Mischen und Inkubieren einer Probelösung mit wenigstens einem Reagenz und Messung eines Parameters im Reaktionsgemisch, wobei die Probelösung von einer Aufgabestelle zu einer Meßstelle transportiert wird, transportiert man die Probelösung zuerst zu einem löslichen Trockenreagenz unter wenigstens teilweiser Auflösung des letzteren und transportiert dann zur Meßstelle weiter und läßt den Transport durch zwei verschiedene Kräfte erfolgen, wobei er wenigstens auf einem Teil der Transportstrecke durch eine auf die Lösung wirkende Grenzflächenkraft als erste Kraft bewirkt wird, der zur Regelung der Transportgeschwindigkeit oder Transportrichtung als zweite Kraft eine Zentrifugalkraft oder/und Druckkraft überlagert wird, die je nachdem, welcher Transportzustand der Flüssigkeit eingestellt werden soll, größer oder kleiner als die erste Kraft gemacht wird. (31 34 611)

DE 3134611 A1

DE 3134611 A1

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen durch Mischen und Inkubieren einer Probelösung mit wenigstens einem Reagenz und Messung eines Parameters im Reaktionsgemisch, wobei die Probelösung von einer Aufgabestelle zu einer Meßstelle transportiert wird, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die Probelösung zuerst zu einem löslichen Trockenreagenz transportiert unter wenigstens teilweiser Auflösung des letzteren und dann zur Meßstelle weitertransportiert und der Transport durch zwei verschiedene Kräfte erfolgt, wobei er wenigstens auf einem Teil der Transportstrecke durch eine auf die Lösung wirkende Grenzflächenkraft als erste Kraft bewirkt wird, der zur Regelung der Transportgeschwindigkeit oder Transportrichtung als zweite Kraft eine Zentrifugalkraft oder/und Druckkraft überlagert wird, die je nachdem, welcher Transportzustand der Flüssigkeit eingestellt werden soll, größer oder kleiner als die erste Kraft gemacht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die erste physikalische Kraft in Richtung oder/und entgegen der Richtung der zweiten physikalischen Kraft einwirken läßt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man den Wert der zweiten physikalischen Kraft mehrmals höher und niedriger als den Wert der ersten physikalischen Kraft einstellt.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man während der Inkubation des Reagenz-Probeflösungs-
gemisches den Wert der zweiten physikalischen Kraft
über den Wert der ersten physikalischen Kraft einstellt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die zweite physikalische Kraft durch Ände-
rung der Drehzahl eines Zentrifugenrotors erhöht
oder erniedrigt.
6. Rotoreinsatzelement zur Durchführung des Verfahrens nach
den Ansprüchen 1 bis 5 mit einer Zentrifugalkraft als
zweiter Kraft, gekennzeichnet durch einen Formkörper (35)
mit einer Probenauftragskammer (31), die mit einer Mehr-
zahl von Reagenzfeldern (32) in Verbindung steht, die
jeweils ein mit einem bestimmten Reagenz imprägniertes
saugfähiges Trägermaterial enthalten, wenigstens einer
Mischventilkammer (33, 33a), einer Meßkammer (34) und
Mittel (36) zum Verschließen der Kammern und Felder.
7. Analyseelement zur Durchführung des Verfahrens nach den
Ansprüchen 1 bis 4 mit einer Druckkraft als zweiter Kraft,
gekennzeichnet durch einen Formkörper (8) mit einer
Probenauftragskammer (9), in der sich ein saugfähiges,
inertes zusammenpreßbares Material befindet, einer Mehr-
zahl von Reagenzträgerfeldern (5, 6, 7), die jeweils ein
mit einem bestimmten Reagenz imprägniertes saugfähiges
zusammenpreßbares Trägermaterial enthalten, einer Meß-
kammer (21), einer Überlaufkammer (10) und einer Ent-
lüftungsbohrung (12), sowie mit zwischen den einzelnen
Reagenzträgerfeldern (5, 6, 7) sowie der Auftragskammer (9)
angeordneten Ventilschlitten (1, 2, 3, 4) mit darin be-

weglich angeordneten Ventilstempeln sowie weiter einer Mehrzahl von Druckstempeln (13, 14, 15, 16) die so angeordnet sind, daß sie unabhängig voneinander auf die Probenauftragskammer (9) und die Reagenzträgerfelder (5, 6, 7) eine bestimmte Druckkraft auszuüben vermögen.

PATENTANWÄLTE

DIPL.-ING. H. WEICKMANN, DIPL.-PHYS. DR. K. FINCKE
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN, DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR. ING. H. LISKA

3134611

- 4 -

HHu

8000 MÜNCHEN 86, DEN **1** Sep. 1981
POSTFACH 860820
MÜHLSTRASSE 22, RUFNUMMER 983921/22

interne Nummer 2464

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Sandhofer Straße 112-132
D-6800 Mannheim-Waldhof

Verfahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen und
hierfür geeignetes Mittel

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen durch Mischen und Inkubieren einer Probelösung mit wenigstens einem Reagenz und Messung eines Parameters im Reaktionsgemisch und ein hierfür geeignetes Mittel.

Die Verwendung von Trockenreagentien auf geeigneten inerten Trägermaterialien ist ein seit langem bekanntes Hilfsmittel bei der Durchführung chem. Reaktionen, die zum qualitativen oder quantitativen Nachweis einer zu analysierenden Substanz herangezogen werden können. Als Beispiele seien genannt: DE-AS 2332 760, DE-OS 2717 817, EPA 0014 797, DE-OS 2752 352, DE-OS 2927 345. Diesen Verfahren ist gemeinsam, daß die in Lösung befindliche Probe auf den Reagenzträger gegeben wird.

- 2 -
- 5 -

Von seinem Auftragsort diffundiert die Probe dann unter Einwirkung von Kapillarkräften in den Träger.

Auf dem Weg werden Reagentien ganz oder teilweise aufgelöst, die auf diese Weise gebildete Reagenz-Probelösung wandert weiter, bis sie schließlich zu einer Meßzone gelangt, wo die Farbintensitätsänderung optisch vermessen wird. Die Meßzone ist jeweils integraler Bestandteil des Reagenzträgers.

Wie nun z. B. aus der DE-OS 2927 345 zu entnehmen ist, werfen Verfahren, bei denen die Diffusionsprozesse ungesteuert ablaufen und bei denen die Remission von Lichtstrahlen direkt auf dem Reagenzträger, der im allgemeinen aus einer opaken Schicht besteht, gemessen wird, beträchtliche Probleme auf. Fasermaterialien zeigen Unregelmäßigkeiten, die im Mikrobereich zu unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Flüssigkeiten führen, es entstehen Zonen mit höheren oder niedrigeren Reagenzkonzentrationen als sie optimal sind. So wird z. B. in der EPA 0014 797 erwähnt, daß "Lufttaschen" in den Trägermaterialien zu zusätzlichen Schwierigkeiten führen und die Schlußfolgerung gezogen, daß Flüssigkeitsströme, die durch Kapillarkräfte erzeugt werden, "kontrolliert" werden müssen.

Der zweite wesentliche Nachteil liegt in der Remissionsmessung selbst:

im Gegensatz zur Durchlicht-Fotometrie gibt es hier keine lineare Beziehung zwischen der Konzentration einer lichtabsorbierenden Substanz und der Extinktion. Man erhält mehr oder weniger stark gekrümmte Eichkurven, in die die Oberflächeneigenschaften stark mit eingehen. Darin ist ein grundsätzlicher Nachteil zu sehen, der die Reproduzierbarkeit eines analytischen Auswerteverfahrens stark negativ beeinflusst. Außerdem können damit Tests, die auf der Messung von

01.08.81

3134611

-2-
-6.

sich bildenden oder abnehmenden Trübungen (turbidimetrische Verfahren) beruhen, grundsätzlich nicht durchgeführt werden. Diese stellen aber bei immunologischen Methoden und auch bei Enzymbestimmungen wie der Lipase-Bestimmung eine weit verbreitete zuverlässige Technik dar.

Ein weiterer Nachteil solcher Analyseelemente ist darin zu sehen, daß unterschiedliche Reaktionsphasen bei mehrstufiger Reaktion auf getrennten Schichten der Analyseelemente nicht gezielt angesteuert werden können. Das heißt, die Startzeitpunkte von Folgereaktionen hängen von der nicht konstanten Diffusionsgeschwindigkeit der Lösung ab.

Auch in der schichtenförmigen Anordnung selbst ist ein Nachteil zu sehen, da die Berührungsflächen von Reagenzien, die sich in Bezug auf ihre Stabilität ungünstig beeinflussen können, relativ groß sind. Günstiger wäre es, solche Reagenzien streng getrennt voneinander in einem Reagenzträger anzuordnen.

Aus obigem geht hervor, daß es im Sinne der Erzielung von Analyseergebnissen mit maximaler Richtigkeit und Reproduzierbarkeit notwendig ist, die genannten Nachteile zu vermeiden, da sie dem Anwendungsbereich solcher "Analyseelemente", die aus Reagenzträgern aufgebaut sind, relativ enge Grenzen setzen.

Aus der Sicht des Benutzers sind solche Testdurchführungstechniken jedoch insofern vorteilhaft, als sie eine sehr einfache Handhabung erlauben, da keine Reagenzlösungen angesetzt werden müssen, da das Pipettieren von Reagenz entfällt, keine Stabilitätsprobleme mit den in Lösung immer instabileren Reagenzien auftreten usw.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, diese Vorteile beizubehalten und gleichzeitig die geschilderten Nachteile zu beseitigen.

- 4 -
- 7 -

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Durchführung analytischer Bestimmungen durch Mischen und Inkubieren einer Probelösung mit wenigstens einem Reagenz und Messung eines Parameters im Reaktionsgemisch, wobei die Probelösung von einer Aufgabestelle zu einer Meßstelle transportiert wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Probelösung zuerst zu einem löslichen Trockenreagenz transportiert unter wenigstens teilweiser Auflösung des letzteren und dann zur Meßstelle weitertransportiert und der Transport durch zwei verschiedene Kräfte erfolgt, wobei er wenigstens auf einem Teil der Transportstrecke durch eine auf die Lösung wirkende Grenzflächenkraft als erste Kraft bewirkt wird, der zur Regelung der Transportgeschwindigkeit oder Transportrichtung als zweite Kraft eine Zentrifugalkraft oder/und Druckkraft überlagert wird, die je nachdem, welcher Transportzustand der Flüssigkeit eingestellt werden soll, größer oder kleiner als die erste Kraft gemacht wird.

Das neue Verfahren verbindet die Vorteile der geschilderten Reagenzträgertechnik mit der Genauigkeit und Fehlerfreiheit üblicher naßchemischer Verfahren.

Erreicht wird dies dadurch, daß die zu analysierende Probelösung (im allgemeinen mit Wasser verdünnt) in eine Eingabestelle gegeben wird, von der aus sie auf dem Weg zu einer Meßstelle einen oder mehrere Träger von Trockenreagenz durchströmt, wobei die Reagenzien ganz oder teilweise gelöst werden. Das Durchströmen geschieht unter strenger Kontrolle der Fließgeschwindigkeiten und damit der Fließzeiten, indem der treibenden Grenzflächenkraft eine zweite Kraft überlagert wird, die den Strom beschleunigen, bremsen oder anhalten kann. Am Ende des Strömungsweges gelangt die Flüssigkeit dann an eine Meßstelle, die nicht mit dem Reagenzträger identisch ist, in der ein Reaktionssignal, vorzugsweise die optische Transmission, gemessen wird.

Als Reagenzien kommen dabei einerseits solche in Frage, die vom Trägermaterial ganz oder teilweise abgelöst werden können, z. B. Puffersubstanzen, Salze, Enzyme oder deren Substrate, andererseits solche, die am Trägermaterial adsorbtiv oder kovalent gebunden sind und an denen dann eine "Festphasen-Reaktion" stattfinden kann, beispielsweise Ionenaustauscher, trägergebundene biologisch aktive Substanzen wie Enzyme, Antikörper oder Antigene und ähnliche.

Für die Messung eines Reaktionssignals eignen sich z. B. außer der schon erwähnten optischen Transmission je nach Ausführungsform der Meßstelle auch Elektrodenpotentiale, elektrische Leitfähigkeit, Fluoreszenzstrahlung usw.

Im folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Zeichnung näher beschrieben. In dieser stellen dar:

Fig. 1a und 1b Oben- bzw. Seitenansicht eines für die Erfindung geeigneten Einzelelementes,

Fig. 2 Darstellung des Elementes von Fig. 1a und 1b auf dem Rotor

Fig. 3, 4 und 5 Ansichten eines anderen Analyseelementes zur Durchführung der Erfindung,

Fig. 6, 7, 8, 9 und 10 erfindungsgemäß erhaltene Analysenergebnisse in graphischer Darstellung.

Je nach den überlagerten Kräften (K_2) gibt es im wesentlichen zwei Ausführungsformen der Erfindung, wobei die treibenden Kräfte (K_1) jeweils Grenzflächen- bzw. Kapillarkräfte sind.

Bei der ersten Ausführungsform ist K_2 eine Zentrifugalkraft.

Bei diesem Analysensystem werden austauschbare Einzelelemente für Zentrifugalanalysenrotoren, die beispielsweise aus einem Plastikformkörper aus Polystyrol, Plexiglas,

Polyurethan u. ä. sowie Reagenzträgerfeldern, die aus einem saugfähigen Trägermaterial, das mit dem Reagenz imprägniert ist, oder anderen kleinen reagenzgefüllten Hohlräumen (z. B. einer Oberflächenstruktur im Plastikkörper), die in den Plastikkörper eingelegt sind, und einer Verschießfolie bestehen, so auf einen Rotor einer Zentrifuge gesteckt, daß die flüssigkeitsbewegende Kapillarkraft von der Zentrifugalkraft gesteuert werden kann. Hierzu ist notwendig, daß verschiedene Drehzahlen und damit Zentrifugalkräfte eingestellt werden können.

Der Analysenablauf bei dieser Ausführungsform der Erfindung wird anhand der Figuren 1a und 1b der beigefügten Zeichnung näher beschrieben. Fig. 1a zeigt ein für die Erfindung geeignetes Einsetzelement in der Aufsicht, Fig. 1b in der Seitenansicht im Schnitt.

Fig. 2 stellt schematisch dar, wie das Einsetzelement von Fig. 1 auf einem geeigneten Zentrifugenrotor, wie er z. B. in der DE-OS 3044372 beschrieben ist, durch hier nicht gezeigte Befestigungsmittel aufgebracht ist.

Wie in Fig. 1a gezeigt, ist in einem Plastikformkörper eine Probenauftragskammer (31) vorgesehen, die mit verschiedenen Reagenzfeldern I bis VII (32) in Verbindung steht. Jedes Reagenzfeld besteht aus einem mit einem bestimmten Reagenz imprägnierten Stück saugfähigen Trägers, wie z. B. Papier oder Vlies. (33) und (33a) sind Mischventile I und II, (34) bezeichnet die Meßstelle (Küvette). Fig. 1b zeigt das Einsetzelement von Fig. 1a in Seitenansicht. (35) bezeichnet den Plastikgrundkörper, (36) die Verschießfolie durch die Probenauftragskammer, Reagenzfelder, Mischventile und Meßstelle abgedeckt sind.

Die Durchführung des Verfahrens der Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf Fig. 1 und 2 näher beschrieben.

01.09.81

3134611

- T -

-10-

Die Probe wird in die Probenauftragskammer (31) gegeben. Dann wird eine bestimmte Drehzahl U_1 eingestellt, die geeignet ist, die Probe an das Reagenzfeld I (32) heranzuführen. Sobald der Kontakt hergestellt ist, saugt die Kapillarkraft die Lösung auf, d. h. die Lösung wird über das Reagenzfeld (32) transportiert. Ist die Zentrifugalkraft Z_1 kleiner als die Kapillarkraft K_1 , bleibt die Lösung, sofern das Aufnahmevolumen des Feldes größer ist als das Volumen der aufgegebenen Probe, in dem Feld (32). Mit der Bedingung $Z_1 < K_1$ ist also die Verweilzeit der Lösung in R I genau festzulegen. Vergrößert man nun die Zentrifugalkraft auf Z_2 , so daß $Z_2 > K_1$ gilt, verläßt die um das auf R I befindliche Reagenz angereicherte Lösung dieses Feld und tritt mit dem Reagenzfeld R II in Kontakt. Hier wiederholt sich der Vorgang. Die Lösung wird über R II verteilt, d. h. weitertransportiert. In Analogie gelten die oben beschriebenen Bedingungen.

Der Vorgang läßt sich beliebig oft wiederholen, wobei im hier skizzierten Fall Reagenzfelder I bis IV durchlaufen werden. Natürlich können die Einsatzelemente anders gestaltet sein und auch mehr oder weniger Reagenzfelder aufweisen. Die Kräfte K_n und Z_n sind praktisch frei wählbar, was vor allem für letztere durch die stufenlose Einstellung von Z technisch sehr einfach realisiert werden kann. Die Durchführung von Analysenverfahren gewinnt dadurch an Vorteilen, daß man die dazu benötigte Zeit so kurz wie möglich hält. Deshalb sollte auch die Verweilzeit der Lösung auf den Reagenzfeldern so kurz wie möglich sein. Es ist möglich, die Zentrifugalkraft Z so groß zu wählen, daß die Lösung von den Kapillarkräften nur gebremst wird, d. h. die Lösung kommt nicht zum Stehen, sondern wandert mit von der Kraft $(Z_n - K_n)$ hervorgerufener Geschwindigkeit durch die entsprechenden Reagenzfelder. Findet dieser Vorgang in Sekunden oder Sekundenbruchteilen statt, so ist

- 8 -
- 11 -

es leicht möglich, daß sich an der Lösungsfront höhere Reagenzkonzentrationen einstellen, d. h. in Richtung Zentrifugalkraft baut sich über das Lösungsvolumen ein Konzentrationsanstieg auf.

Zur Einhaltung definierter Reaktionsbedingungen gehört es jedoch, einheitliche Konzentrationsverhältnisse - wenn nötig - einzustellen. Um derartige Inhomogenitäten zu beseitigen, wird erfindungsgemäß ein sogenanntes Mischventil (33) vorgesehen. Das Mischventil (33) weist eine in Richtung der Zentrifugalkraft geschlossene Begrenzungswand auf. Am Boden ist eine schräg nach unten entgegen der Strömungsrichtung von Probeauftragskammer zu Meßstelle angeordnete grenzflächenaktive Kammer, z. B. Kapillare angeordnet, welche an ihrem unteren Ende umbiegt und zum Reagenzfeld V weiterführt. Solange die Zentrifugalkraft Z_3 größer ist als die Kapillarkraft in der Bodenkapillare K_3 , wird die Flüssigkeit an der Begrenzungswand festgehalten. Senkt man Z_3 unter den Wert von K_3 , so saugt die Kapillare die Flüssigkeit selbständig aus dem Mischraum (33) in die zugehörige Kapillare ab, wobei vorher bestehende Gradienten beseitigt werden und die Kapillarkraft transportiert die Flüssigkeit zum Reagenzfeld V. Allgemein ausgedrückt wirkt daher hier die Kapillarkraft in der Kapillare des Mischventils (33) immer als Transportkraft, wenn $Z < K$ ist.

Die Standzeit im Mischventil (33) ist wiederum frei wählbar durch die Einstellung der Bedingung $Z_M > K_M$. Die Bedingung für den Transport ist also genau umgekehrt zu den oben beschriebenen Bedingungen.

Die weiteren Schritte über die Reagenzfelder V bis VII und über das Mischventil II (33a) brauchen nicht erneut beschrieben werden, sie ergeben sich aus Analogiebetrachtungen zu den vorigen Schritten. In der erläuterten Ausführungsform ist das Mischventil (33a) hilfreich, um eine homogene Lösung

in die Küvette (34) zu befördern. In bekannten Ausführungsformen von Zentrifugalanalysen ist das Mischen ein aufwendiger Vorgang, der z. B. durch starkes Beschleunigen und Abbremsen der Zentrifuge oder das Durchströmen der Lösung mit Luft bewirkt wird. Dies wird erfindungsgemäß mit technisch einfachen Mitteln vermieden.

Bei der zweiten Ausführungsform der Erfindung ist K_2 eine Druckkraft.

In den Fig. 3, 4 und 5 der Zeichnung werden für diese Ausführungsform geeignete Mittel in Form von wegwerfbaren Analyselementen dargestellt.

In Fig. 3 ist ein derartiges Element in Aufsicht, in Fig. 4 in der Seitenansicht schematisch dargestellt. Der aus einem geeigneten Material, wie z. B. Plastik bestehende Formkörper (8) weist Reagenzträgerfelder (5, 6, 7) auf, die in den Plastikkörper eingelegt sind. Durch eine elastische Verschießfolie (11) sind diese Reagenzträgerfelder abgedeckt. Eine Probenauftragskammer (9) enthält ein saugfähiges inertes zusammenpreßbares Material, das beispielsweise in entlastetem Zustand 15 μ l Flüssigkeit aufnehmen kann und im zusammengepreßten Zustand beispielsweise 2 μ l Flüssigkeit zurückhält. Eine Ausbuchtung im Körper (8) dient als Meßstelle bzw. Küvette (21). Der Körper (8) weist außerdem eine Überlaufkammer (10) und eine Entlüftungsbohrung (12) auf.

Ventilschlitze (1, 2, 3, 4) dienen zur Aufnahme von Ventilstempeln, mit denen die einzelnen Reagenzträgerfelder voneinander getrennt werden können. Außerdem sind Druckstempel (13, 14, 15, 16) vorgesehen, deren Grundfläche genau der Fläche der jeweiligen Reagenzträgerfläche entspricht und die dazu dienen, gefüllte Reagenzfelder zusammenzudrücken (Fig. 5).

Der Verfahrensablauf bei dieser Ausführungsform der Erfindung ist folgendermaßen:

Die Probe wird in die Auftragskammer (9) gebracht, indem die Folie (11) mit einer Nadel durchstochen wird. Es wird eine solche Menge injiziert, daß sich das inerte, saugfähige Vlies in der Kammer (9) vollständig füllt, aber keine Lösung abgibt. Anschließend wird z. B. durch eine geeignete Steuerungsvorrichtung, der Stempel (13) auf das Feld (9) gedrückt, so daß die Flüssigkeit dieses Feld verlassen muß und mittels der Kapillarkraft in das Feld (5) transportiert wird. Über die Kohäsion der Flüssigkeit wird diese praktisch vollständig nach (5) überführt. Anschließend wird der Ventilstempel (17) z. B. ebenfalls über einen geeigneten Mechanismus gesteuert, heruntergedrückt, so daß (5) von der Auftragskammer (9) abgetrennt ist. Die Folie (11) paßt sich jeweils den Konturen an und dient als Dichtmembran. Die Probelösung kann eine frei wählbare Zeit lang im Feld (5) stehen gelassen werden. In der Regel löst sich allerdings das im Feld (5) befindliche Trockenreagenz innerhalb weniger Sekunden.

Im nächsten Schritt wird der Stempel (14) auf das Feld (5) gedrückt, so daß die Flüssigkeit dieses Feld verlassen muß und über die kapillare Ansaugwirkung des Feldes (6) in dieses hineintransportiert wird. Danach wird der Ventilstempel (18) heruntergedrückt, so daß der Kontakt zu Feld (5) unterbrochen ist. Wiederum kann die Zeit zur Ab- oder Auflösung des Reagenz in Feld (6) frei gewählt werden (wobei es sich wiederum im allgemeinen um Sekunden dauernde Vorgänge handelt).

Sollte sich bei dem Flüssigkeitstransport durch Kapillarkräfte und bei dem Einstromen in das Reagenzfeld ein Konzentrationsgradient aufbauen, kann dieser dadurch beseitigt werden, daß man vor den Weitertransport nach Feld (7) einen Mischvorgang einschaltet. Durch Andrücken des Ventilstempels (19), Abheben des Ventilstempels (18) und des Stempels (14)

und Andrücken des Stempels (15), wird die Flüssigkeit nach Feld (5) zurücktransportiert. Durch Anheben von Stempel (15) und Andrücken von Stempel (14) wird die Flüssigkeit wieder nach Feld (6) zurückbefördert. Gegebenenfalls kann diese Vor-Rück-Bewegung mehrere Male wiederholt werden. Zum Schluß wird dann wieder der Zustand hergestellt: Stempel (14) ange-drückt, Ventilstempel (18) angedrückt.

Der Weitertransport der Flüssigkeit von Feld (6) nach Feld (7) erfolgt nach gegebenenfalls Abheben von Ventilstempel (19) in analoger Weise durch Andrücken von Ventilstempel (18) und Andrücken von Stempel (15). Gegebenenfalls kann der Mischvorgang zwischen Feld (6) und Feld (7) in Analogie zur beschriebenen Weise unter Benutzung von Ventilstempel (20) wiederholt werden.

Nach Auflösen des Reagenz in Feld (7) wird die so ent-standene Lösung dann durch Andrücken von Ventilstempel (19) und Andrücken von Stempel (15) in die Küvette (21) gedrückt.

Danach wird in geeigneter Weise in einem üblichen Verfahren die Extinktionsänderung während einer genügend langen Zeit gemessen. Aus dieser Signaländerung kann ebenfalls mit üblichen Methoden die Konzentration der zu analysierenden Substanz berechnet werden.

Die für die Durchführung der für das Verfahren erforderliche Änderung der 1. bzw. 2. Kraft zur Verfügung stehenden Maß-nahmen sind für die Zentrifugalkraft in erster Linie in Drehzahländerungen, für die Druckkraft in Bewegung von Druck-stempeln zu sehen. Die Grenzflächenkraft kann außer durch die Oberflächengestaltung auch durch Einsatz oberflächenakti-ver Mittel geregelt bzw. verändert werden.

Beispiele für erfindungsgemäß durchführbare Analysen sind die in der DE-OS P 30 44 385 beschriebenen. Insbesondere eignet sich das Verfahren zur Bestimmung von Glucose, Bilirubin, Creatinin, Albumin, Eiweiß, Eisen, Hämoglobin, Harnstoff, Harnsäure, Triglyceriden, Cholesterin, Chlorid, Kalzium, Phosphat, γ -GT, alkalischer Phosphate, GOT, GPT, Lactatdehydrogenase, Lipase, Amylase, Creatinkinase, Schilddrüsenhormonen, saure Phosphatase, Drogen, Krebsindikatoren und Gerinnungsfaktoren, wobei jeweils für diese Bestimmungen an sich bekannte Reagenzien eingesetzt werden können.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

B e i s p i e l 1

Glucosebestimmung unter Verwendung des Einselementes gemäß Fig. 1 und 2.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm wurden folgende Reagenzien aufgebracht und wie aus Fig. 1 ersichtlich, im beschriebenen Einselement positioniert:

III	Natriumphosphatpuffer	630 μ g
	2,4-Dichlorphenolsulfonsäure	466 μ g
IV	4-Aminoantipyrin	24 μ g
VII	GOD (E.C. 1.1.3.4)	2200 mU
	POD (E.C. 1.11.1.7)	400

Humanserumproben wurden 1 : 200 mit bidest. Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 60 μ l in die Probenauftragskammer (1) gegeben.

01.09.81

3134611

-13-
-16-

Es wurde bei 25 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

1. 10 sec 180 Upm Anfeuchten der ersten Vliese
2. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 1. Mischventil (3)
3. 15 sec 0 Upm Überführung nach V
4. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 2. Mischventil (3a)
5. 15 sec 0 Upm Entleeren des 2. Mischventils (3a)
6. 10 sec 150 Upm Überführen in die Küvette (4)
7. 5 sec 1500 Upm Austreiben von Luftblasen
8. 225 sec 360 Upm Messung bei 500 nm

Die Änderung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit wurde gemessen und nach einem der üblichen "Fixed-time-kinetischen Verfahren" ausgewertet. Die unbekannten Konzentrationen an Glucose in der Probe wurden nach Eichung des Verfahrens mit einem Standard bestimmt. Die Übereinstimmung mit einer Vergleichsmethode, der eine der bekannten manuellen Techniken zugrunde liegt, ist sehr gut, wie aus Fig. 6 zu erkennen ist, welche die Ergebnisse der Vergleichsmethode auf der Abscisse, der erfindungsgemäßen Methode auf der Ordinate zeigt.

Auf der Ordinate sind auch in den folgenden Beispielen die Werte mit der erfindungsgemäßen Methode aufgetragen (Symbol ZF).

Beispiel 2

Alkalische Phosphatase wurde auf dem Einsatzelement gemäß Fig. 1 und 2 bestimmt.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm wurden folgende Reagenzien aufgebracht und wie aus Fig. 1 ersichtlich, positioniert:

- 14 -
- 17 -

II	Natriumkarbonatpuffer	1200 µg
	Magnesiumaspartat	16 µg
III	Natriumkarbonatpuffer	1200 µg
	Magnesiumaspartat	16 µg
VI	Tris-p-Nitrophenylphosphat	313 µg
	Tris	31 µg

Eine Humanserumprobe wurde 1 : 10 mit bidest. Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 60 µl in die Probenauftragskammer (1) gegeben.

Es wurde bei 37 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

1. 10 sec 180 Upm Anfeuchten der ersten Vliese
2. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 1. Mischventil (3)
3. 15 sec 0 Upm Überführung nach V
4. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 2. Mischventil (3a)
5. 15 sec 0 Upm Entleeren des 2. Mischventils (3a)
6. 10 sec 150 Upm Überführen in die Küvette (4)
7. 5 sec 1500 Upm Austreiben von Luftblasen
8. 225 sec 360 Upm Messung bei 410 nm

Die aufgezeichneten Abhängigkeiten der Extinktionen von der Zeit wurden nach einem der üblichen Verfahren, bei denen die Steigung der Geraden ein Maß für die Aktivität des zu bestimmenden Enzyms ist, ausgewertet. Die unbekannten Aktivitäten an Alkalischer Phosphatase in der Probe wurden nach Eichung des Verfahrens mit einem Standard bestimmt. Die Korrelation mit einer Vergleichsmethode, der eine der bekannten manuellen Techniken zugrunde liegt, ist gut, wie aus Fig. 7 zu erkennen ist.

01.09.81

3134611

- 45 -

- 18 -

B e i s p i e l 3

Bilirubin-Bestimmung mit dem Einsatzelement von Fig. 1 und 2.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm wurden folgende Reagentien aufgebracht und wie aus Fig. 1 ersichtlich, positioniert:

II 2,5-Dichlorphenyldiazonium-naphtolsulfonat 68 µg

III Cetylpyridiniumchlorid 1600 µg
Weinsäure 2400 µg

V Nicht imprägniertes Filterpapier

Serumproben wurden 1 : 10 mit bidest. Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden je 60 µl in die Probenauftragskammer (1) gegeben.

Es wurde bei 25 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

1. 10 sec 180 Upm Anfeuchten der ersten Vliese
2. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 1. Mischventil (3)
3. 15 sec 0 Upm Überführung nach V
4. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 2. Mischventil (3a)
5. 15 sec 0 Upm Entleeren des 2. Mischventils (3a)
6. 10 sec 150 Upm Überführen in die Küvette (4)
7. 5 sec 1500 Upm Austreiben von Luftblasen
8. 225 sec 360 Upm Messung bei 550 nm

Die aufgezeichneten Abhängigkeiten der Extinktionen von der Zeit wurden nach einem der üblichen "Endpunkt-Verfahren" ausgewertet; die unbekannten Konzentrationen an Bilirubin in der Probe wurden nach Eichung des Verfahrens mit einem Standard bestimmt. Die Übereinstimmung mit einer Vergleichsmethode, der eine der bekannten manuellen Techniken zugrunde liegt, ist sehr gut, wie Fig. 8 zeigt.

B e i s p i e l 4

Creatinkinase-Bestimmung mit dem Einsatzelement von Fig. 1 und 2.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm wurden folgende Reagenzien aufgebracht und wie aus Fig. 1 ersichtlich, positioniert:

IV	Imidazol	424 µg
	Glucose	240 µg
	Magnesiumchlorid · 6H ₂ O	128 µg
	EDTA-Natrium-Salz	47 µg
	N-Acetylcystein	205 µg
	Adenosinmonophosphat-Natrium-Salz	157 µg
	Adenosindiphosphat	54 µg
	Diadenosinpentaphosphat-Lithium-Salz	0,6 µg
	NADP-Natrium-Salz	110 µg
V	Hexokinase (E.C. 2.7.1.1.)	218 mU
	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49)	123 mU
	Creatinphosphat-Natrium-Salz	615 µg

Eine Humanserumprobe wurde 1 : 25 mit bidest. Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 60 µl in die Probenauftragskammer (1) gegeben.

Es wurde bei 37 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

1. 10 sec 180 Upm Anfeuchten der ersten Vliese
2. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 1. Mischventil (3)
3. 15 sec 0 Upm Überführung nach V
4. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 2. Mischventil (3a)
5. 15 sec 0 Upm Entleeren des 2. Mischventils (3a)
6. 10 sec 150 Upm Überführen in die Küvette (4)
7. 5 sec 1500 Upm Austreiben von Luftblasen
8. 225 sec 360 Upm Messung bei 340 nm

Die aufgezeichneten Abhängigkeiten der Extinktionen von der Zeit wurden nach einem der üblichen Verfahren für kinetische Messungen ausgewertet, die unbekannten Aktivitäten an Creatinkinase in der Probe wurden nach Eichung des Verfahrens mit einem Standard bestimmt. Die Übereinstimmung mit einer Vergleichsmethode, der eine der bekannten manuellen Techniken zugrunde liegt, ist sehr gut, wie Fig. 9 zeigt.

Beispiel 5

IgG-Bestimmung mit dem Einsatzelement von Fig. 1 und 2.

Auf Filterpapiere der Größe 6 x 6 mm und der Dicke 0,3 mm wurden folgende Reagenzien aufgebracht und wie aus Fig. 1 ersichtlich, positioniert (in diesem Fall wurden zwei verschiedene Reagenzträgerpapiere in die gleiche Kammer gegeben):

V	Natriumhydrogenphosphat $\cdot 2H_2O$	620 μg
	Kaliumdihydrogenphosphat	107 μg
	Polyäthylenglycol 6000	1570 μg
V	Antikörper gegen IgG (Titer = 16 mg/ml)	258 μg

Eine Humanserumprobe wurde 1 : 200 mit bidest. Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 60 μl in die Probenauftragskammer (1) gegeben.

Es wurde bei 25 °C nach folgendem Programm zentrifugiert:

1. 10 sec 180 Upm Anfeuchten der ersten Vliese
2. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 1. Mischventil (3)
3. 15 sec 0 Upm Überführen nach V
4. 10 sec 1500 Upm Ausschleudern in 2. Mischventil (3a)

- 18 -
- 21 -

5. 15 sec 0 Upm Entleeren des 2. Mischventils (3a)
6. 10 sec 150 Upm Überführen in die Küvette (4)
7. 5 sec 1500 Upm Austreiben von Luftblasen
8. 225 sec 360 Upm Messung bei 340 nm

Die aufgezeichneten Abhängigkeiten der Extinktionen von der Zeit wurden nach einem der üblichen Verfahren zur Auswertung von kinetischen Trübungstesten ausgewertet, die unbekannten Konzentrationen an IgG in der Probe werden nach Eichung des Verfahrens mit 3 Standards unterschiedlicher Konzentration und Erstellung einer Eichkurve bestimmt. Die Übereinstimmung mit einer Vergleichsmethode, der eine Adaptation auf dem Analysenautomaten "ABA 100" der Firma ABBOTT zugrunde liegt, ist sehr gut, wie Fig. 10 zeigt.

Beispiel 6

Glucosebestimmung mit dem Analyseelement gemäß Fig. 3.

Reagenzträgerpapiere der Größe 6 x 6 x 0,3 mm werden wie folgt hergestellt: 10 µl der Reagenzlösungen, die ein Viertel der Substanzmengen enthalten wie die verschiedenen Papiere des Beispiels in Beispiel 1, werden auf ein Papier der angegebenen Größe gegeben. Die Lösungen werden vollständig aufgesaugt; anschließend wird das Lösungsmittel Wasser durch Lyophilisieren aus den Papieren entfernt.

Die drei verschiedenen Papiere werden in der gleichen Reihenfolge wie in Beispiel 1 auf die drei Positionen des Analyseelements von Fig. 3 gelegt.

Die Probe wird 1 : 200 mit biest. Wasser verdünnt. 15 µl dieser verdünnten Lösung werden in die Auftragskammer (9) gegeben. Dann wird die Lösung in der oben geschilderten

- 22 -

Weise auf den ersten Reagenzträger (5) gebracht. Verweilzeit: 10 sec. Anschließend wird die Lösung aus (5) nach (6) in ebenfalls bereits geschilderter Art und Weise gebracht. Verweilzeit: 10 sec. In analoger Weise wird die Lösung auf den Reagenzträger 3 (7) gebracht. Verweilzeit: 5 sec. Von dort wird die Lösung durch langsames Absenken des Stempels (16) in die Küvette (21) gebracht. In ihr wird in bekannter Weise die Extinktion bei 500 nm in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Aus dem Verlauf dieser Kurve kann mit dem bekannten "Fixed-time-kinetischen" Verfahren nach Eichung mit einem Standard die Glucosekonzentration in unbekannten Proben bestimmt werden.

Es wurden wäßrige Lösungen mit den Konzentrationen 50, 100, 150, 200, 300 und 400 mg/dl (durch Einwaage eingestellt) untersucht. Die Wiederfindung lag zwischen 98 und 102 %.

B e i s p i e l 7

Alkalische Phosphatase mit dem Element gemäß Fig. 3.

Reagenzträgerpapiere der Größe 6 x 6 x 0,3 mm werden wie folgt hergestellt: 10 µl der Reagenzlösungen, die genau ein Viertel der Substanzmengen enthalten wie die verschiedenen Papiere des Beispiels 2, werden auf ein Papier der angegebenen Größe gegeben. Die Lösungen werden vollständig aufgesaugt; anschließend wird das Lösungsmittel Wasser durch Lyophilisieren aus den Papieren entfernt.

Die beiden Papiere werden in der gleichen Reihenfolge wie in Beispiel 2 auf die ersten beiden Positionen des Analysenelements von Fig. 3 gelegt. Auf die dritte Position wird ein Papier gelegt, das kein Reagenz enthält.

Die Probe wird 1 : 10 mit bidest. Wasser verdünnt. 15 µl dieser verdünnten Lösung werden in die Auftragskammer (9) gegeben. Dann wird die Lösung in der geschilderten Weise auf den ersten Reagenzträger (5) gebracht. Verweilzeit: 10 sec. Anschließend wird die Lösung aus (5) nach (6) in ebenfalls bereits geschilderter Art und Weise gebracht. Verweilzeit: 10 sec. In analoger Weise wird die Lösung auf das Leervlies (7) gebracht. Verweilzeit: 5 sec. Von dort wird die Lösung durch langsames Absenken des Stempels (16) in die Küvette (21) gebracht. In ihr wird die Extinktion bei 410 nm in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Aus dem Verlauf der aufgezeichneten Geraden kann mit bekannten kinetischen Bestimmungsverfahren nach Eichung mit einem Standard die Aktivität der alkalischen Phosphatase in unbekannten Proben bestimmt werden.

Es wurden verschiedene Kontrollseren, die Aktivitäten zwischen 30 und 600 U/l enthielten, untersucht. Die Wiederfindung lag zwischen 90 und 110 %.

Beispiel 8

Creatinkinasebestimmung mit dem Element gemäß Fig. 3.

Reagenzträgerpapiere der Größe 6 x 6 x 0,3 mm werden wie folgt hergestellt: 10 µl der Reagenzlösungen, die genau ein Viertel der Substanzmengen enthalten wie die verschiedenen Papiere des Beispiels 4, wurden auf ein Papier der angegebenen Größe gegeben. Die Lösungen werden vollständig aufgesaugt; anschließend wurde das Lösungsmittel Wasser durch Lyophilisieren aus den Papieren entfernt.

Die beiden Papiere wurden in der gleichen Reihenfolge wie in Beispiel 4 auf die ersten beiden Positionen des Analysenelements von Fig. 3 gelegt. Auf die dritte Position wurde ein Papier der gleichen Art, das kein Reagenz enthielt, gelegt.

01.09.81

3134611

- 24 -

- 24 -

Die Probe wurde 1 : 25 mit bidest. Wasser verdünnt. 15 μ l dieser verdünnten Lösung wurden in die Auftragskammer (9) gegeben. Dann wird die Lösung in der geschilderten Weise auf den ersten Reagenzträger (5) gebracht. Verweilzeit: 10 sec. Anschließend wurde die Lösung aus (5) nach (6) in ebenfalls bereits geschilderter Art und Weise gebracht. Verweilzeit: 10 sec. In analoger Weise wurde die Lösung auf das Feld (7) bewegt. Verweilzeit: 5 sec. Von dort wird die Lösung durch langsames Absenken des Stempels (16) in die Küvette (21) gebracht. In ihr wird in bekannter Weise die Extinktion bei 340 nm in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Nach einer gekrümmten Anfangsphase erhielt man einen linearen Verlauf dieser Funktion. Aus diesem Anteil wird mit Hilfe von bekannten Auswerteverfahren für kinetische Methoden nach Eichung mit einem Standard die Aktivität an Creatinkinase in einer unbekannten Probe bestimmt.

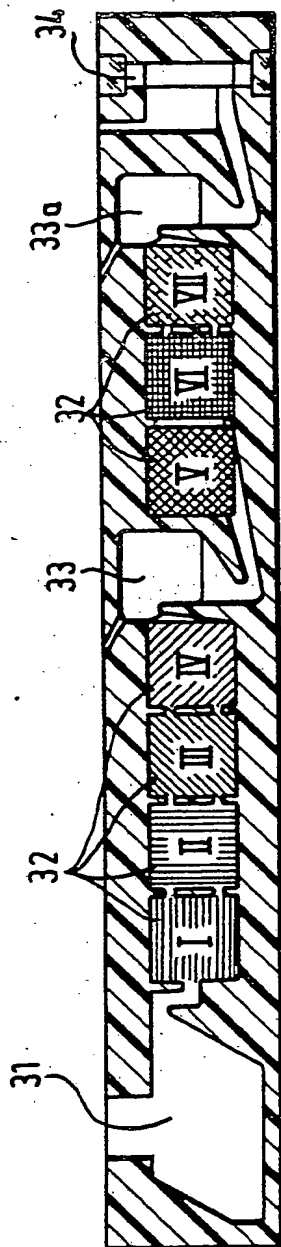
Es wurden verschiedene Humanserumproben mit aufgereinigtem Enzym in der Weise aufgestockt, daß man Aktivitäten von 5 bis 800 U/l erhielt. Vergleichswerte wurden durch eine manuelle Messung gewonnen. Die Wiederfindungen gegenüber diesen manuellen Werten lagen zwischen 92 und 110 %.

~~-25-~~
Leerseite

THIS PAGE BLANK (USPTO)

NACHGEREICHT

FIG. 1a



- 33 -

Nummer:
Int. Cl.³:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

3134611
G01N 1/28
1. Septemb r 1981
10. März 1983

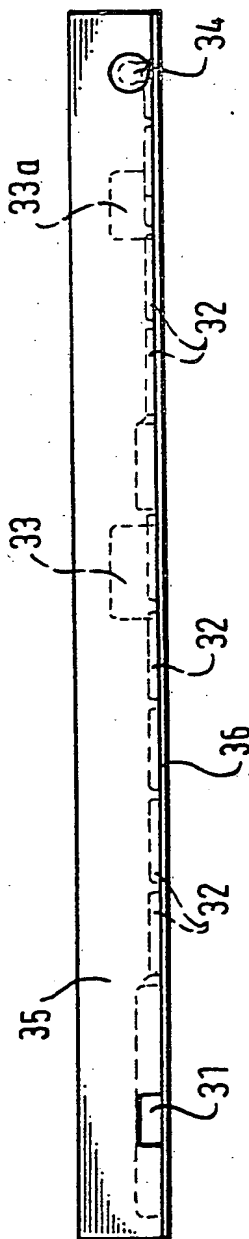


FIG. 1b

16.11.91

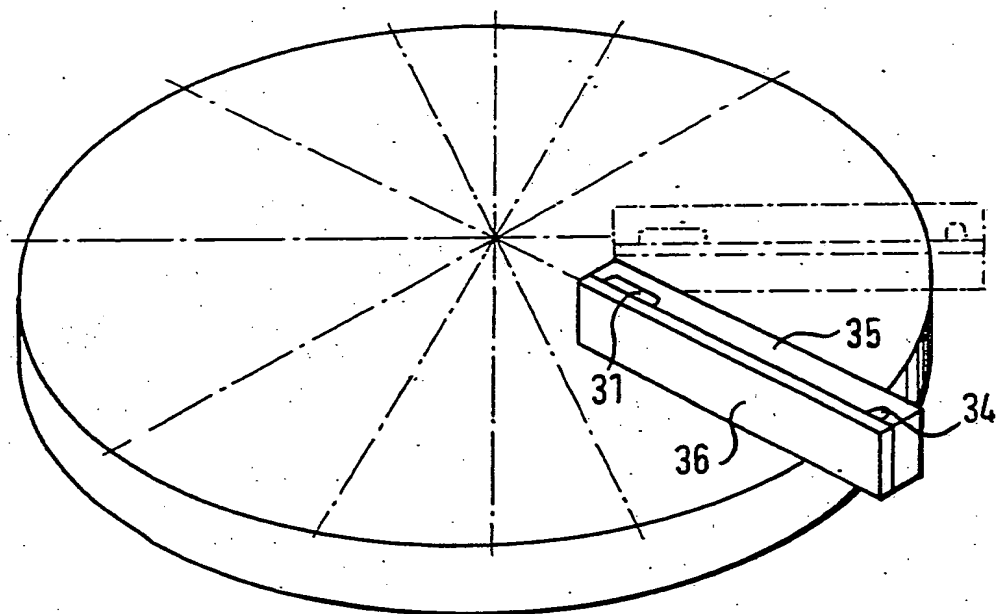
2/8

3134611

NACHGEREICHT

- 26 -

FIG. 2



NACHGEREICHT

FIG. 3

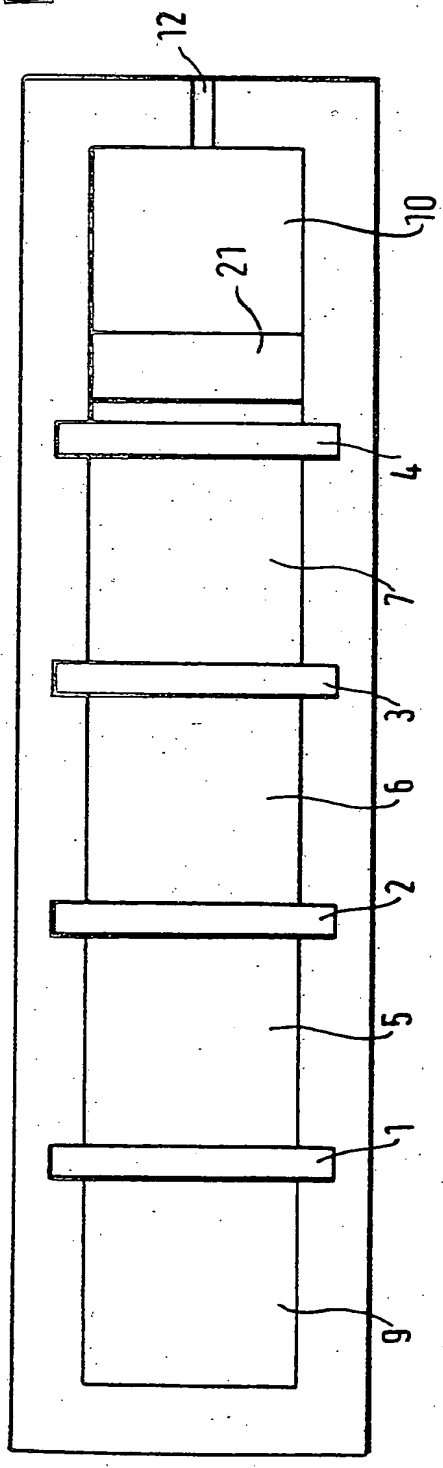


FIG. 4

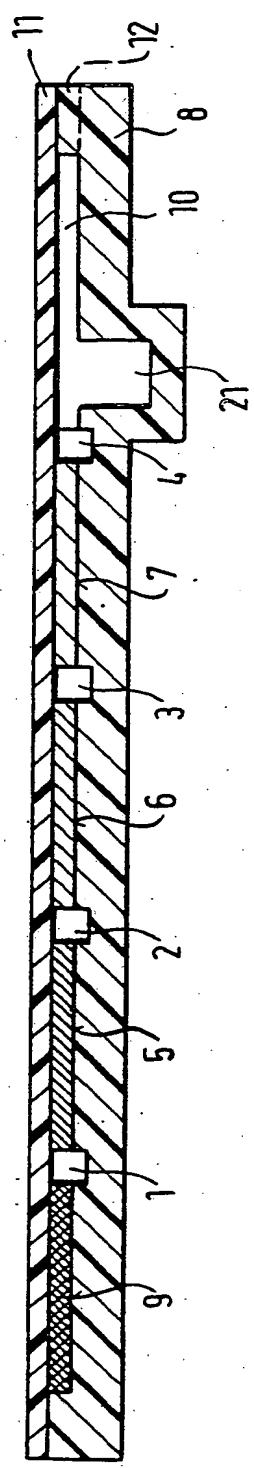
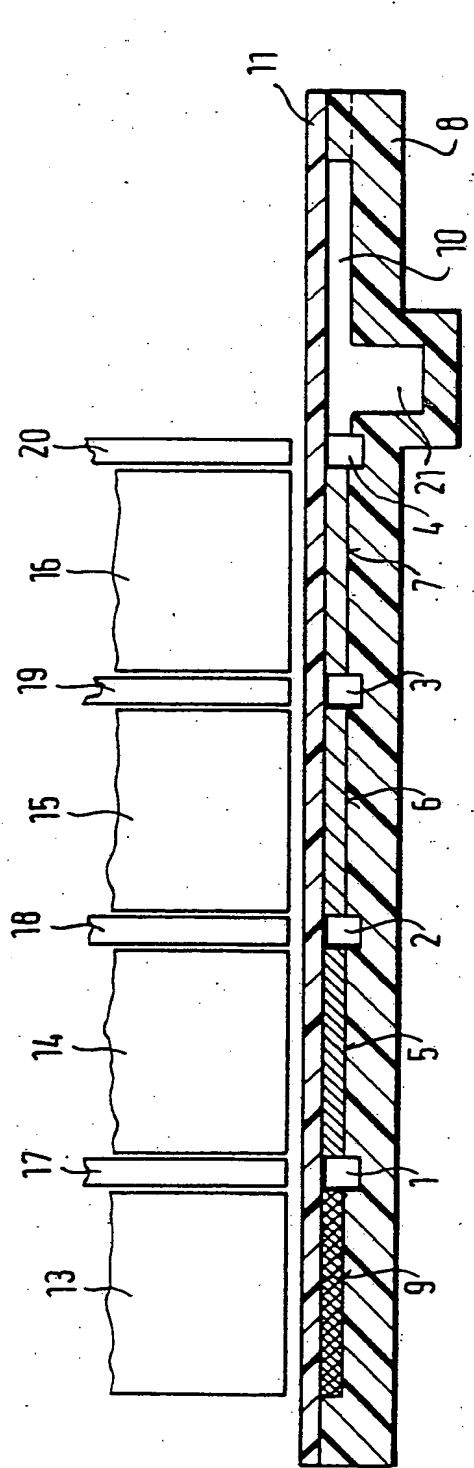


FIG. 5



18 11 84

4/1

3134611

-28-

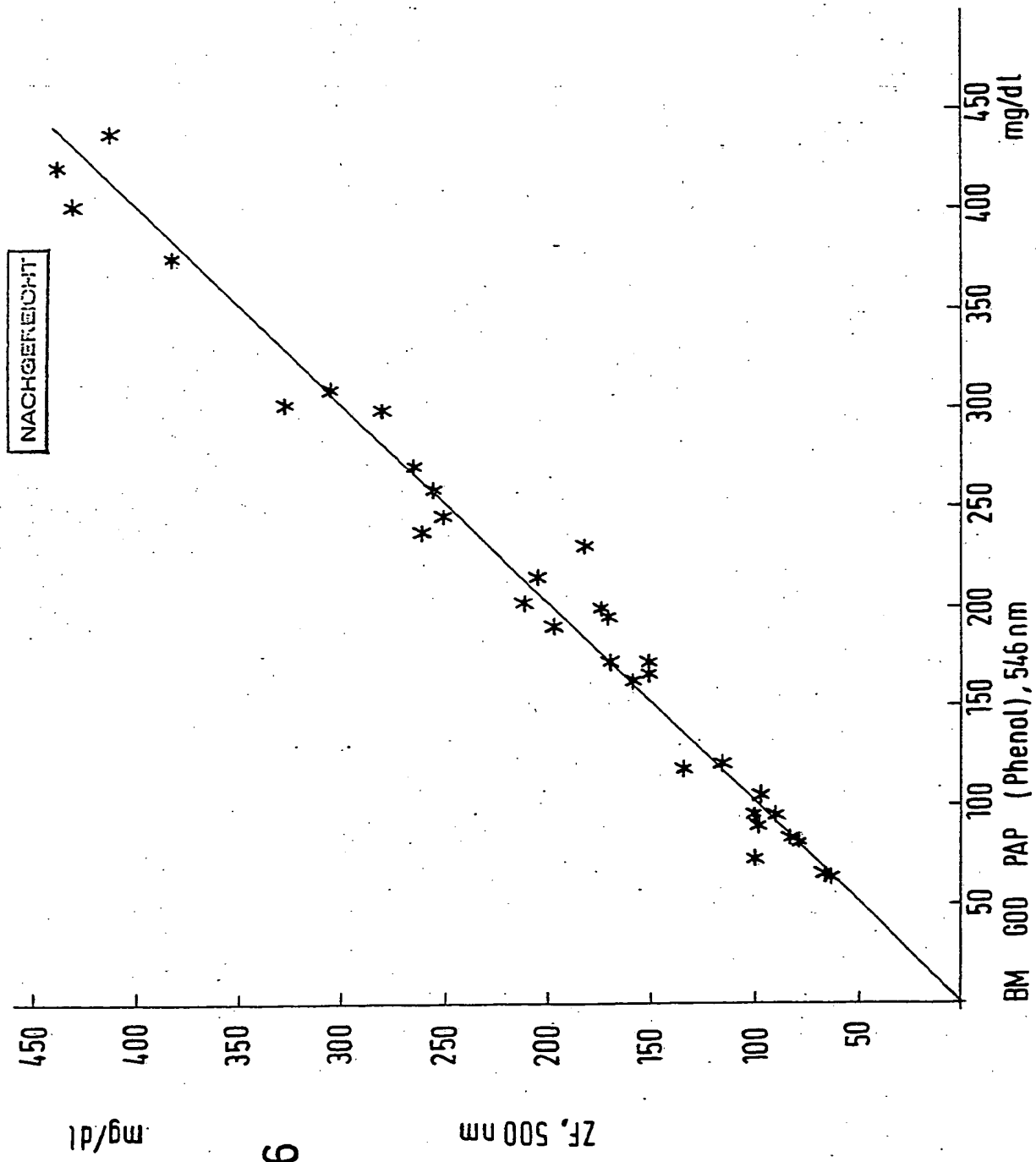
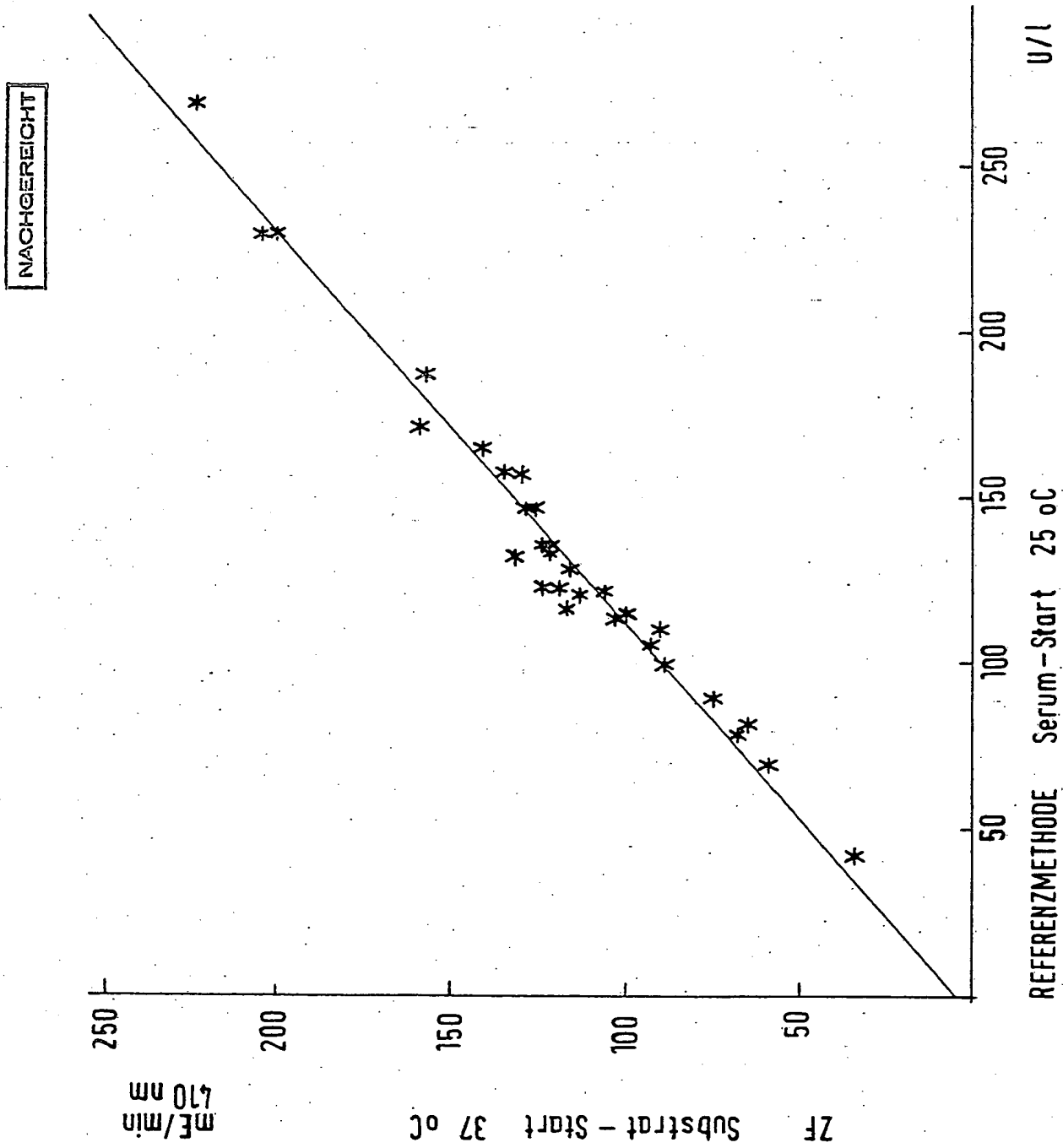
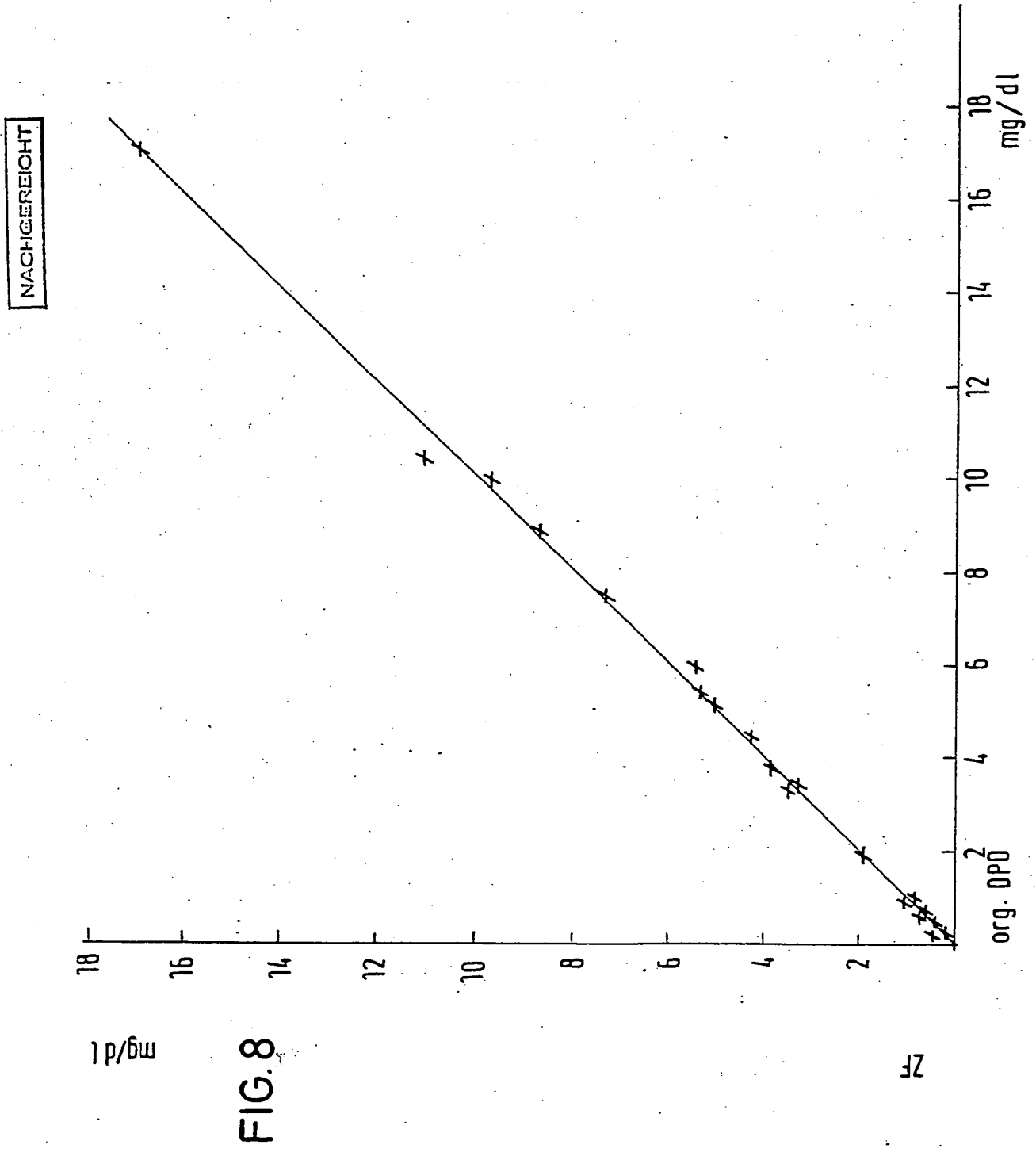


FIG.6

-29-

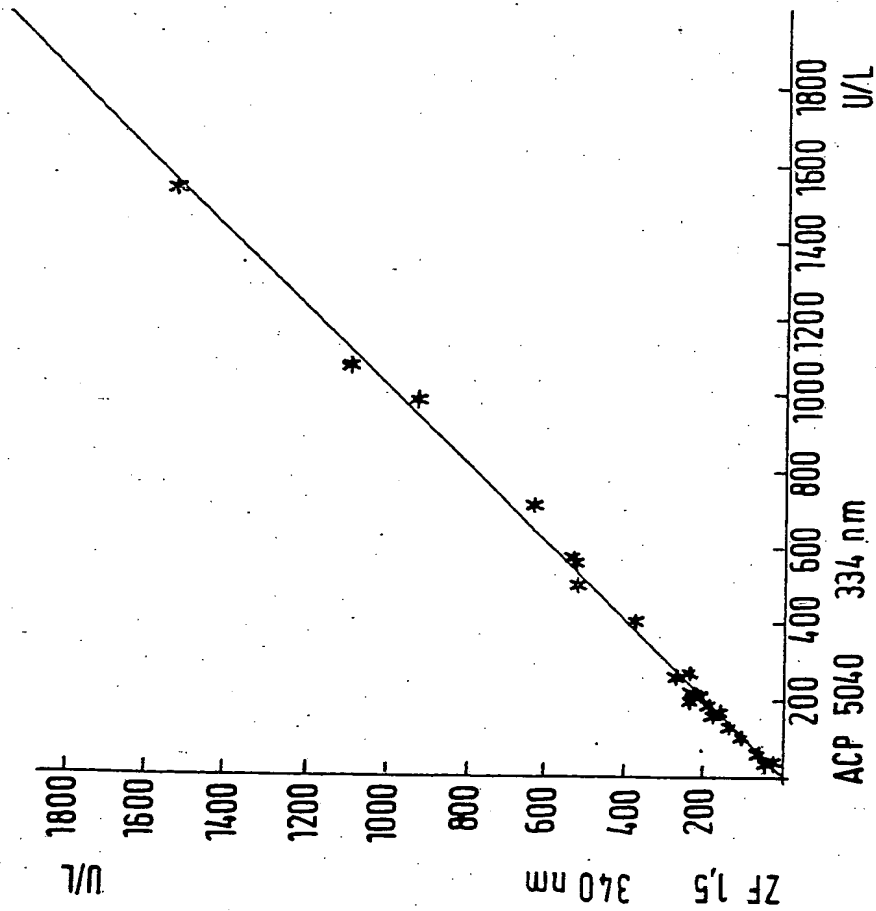


-30-



-3A-

NACHGEREICHT



3134611

-32

NACHGEREICHT

